

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
(PCT18条、PCT規則43、44)

出願人又は代理人 の書類記号	T 6 0 9 / H O P - G T	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP01/06619	国際出願日 (日.月.年)	0 1 . 0 8 . 0 1	優先日 (日.月.年) 0 1 . 0 8 . 0 0
出願人 (氏名又は名称) 鐘淵化学工業株式会社			

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条 (PCT18条) の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。
☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない (第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している (第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は

☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条 (PCT規則38.2(b)) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、
第 _____ 図とする。

☐ 出願人が示したとおりである。

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

☒ なし



(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002年2月7日 (07.02.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/10399 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/53, 9/02, 1/21, C12P 17/10, C12N 15/53, C12R 1/265 (74) 代理人: 安富康男, 外(YASUTOMI, Yasuo et al.): 〒532-0011 大阪府大阪市淀川区西中島5丁目4番20号 中央ビル Osaka (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/06619 (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (22) 国際出願日: 2001年8月1日 (01.08.2001) (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ユーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願2000-232756 2000年8月1日 (01.08.2000) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 鐘淵化学工業株式会社 (KANEKA CORPORATION) [JP JP]: 〒530-8288 大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 木崎憲之 (KIZAKI, Noriyuki) [JP JP]: 〒570-0016 大阪府守口市大日東町12-11-403 Osaka (JP), 八十原良彦 (YASOHARA, Yoshihiko) [JP JP]: 〒670-0942 兵庫県姫路市日出町3丁目7-2-605 Hyogo (JP), 長谷川淳三 (HASEGAWA, Junzo) [JP JP]: 〒674-0057 兵庫県明石市大久保町高丘2丁目13-4 Hyogo (JP).
- 添付公開書類:
国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL CARBOXYL REDUCTASE GENE THEREOF AND METHOD OF USING THE SAME

WO 02/10399 A1

(54) 発明の名称: 新規カルボニル還元酵素、その遺伝子、およびその利用法

(57) Abstract: Novel polypeptides capable of forming (S)-N-benzyl-3-pyrrolidinol, DNA encoding the same and a method of using the same. A polypeptide having the following physicochemical properties (1) to (5): (1) function: asymmetrically reducing N-benzyl-3-pyrrolidinone by using NADPH as a coenzyme to form (S)-N-benzyl-3-pyrrolidinol; (2) optimum functional pH: 4.5 to 5.5; (3) optimum functional temperature: 40 to 45°C; (4) molecular weight: about 29,000 in gel filtration analysis, about 35,000 in SDS polyacrylamide electrophoresis; and (5) inhibitor: being inhibited by divalent copper ion. A polypeptide having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO. 1, or a polypeptide having an amino acid sequence derived from the amino acid sequence represented by SEQ ID NO. 1 by the substitution, insertion, deletion and/or addition of one or more amino acids and having an enzymatic activity of asymmetrically reducing N-benzyl-3-pyrrolidinone to form (S)-N-benzyl-3-pyrrolidinol.

[続葉有]



(57) 要約:

本発明は、(S)-N-ベンジル-3-ピロリジノールを生成する新規ポリペプチド、それをコードするDNAおよびその利用方法を提供する。

以下の(1)から(5)の理化学的性質を有するポリペプチド：(1)作用：NADPHを補酵素として、N-ベンジル-3-ピロリジノンを不斉的に還元して(S)-N-ベンジル-3-ピロリジノールを生成する、(2)作用至適pH：4.5から5.5、(3)作用至適温度：40℃から45℃、(4)分子量：ゲル濾過分析において約29000、SDSポリアクリルアミド電気泳動分析において約35000、(5)阻害剤：二価銅イオンにより阻害される。さらに、配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドか、あるいは、配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が置換、挿入、欠失および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつN-ベンジル-3-ピロリジノンを不斉的に還元して(S)-N-ベンジル-3-ピロリジノールを生成する酵素活性を有するポリペプチドである。

明細書

新規カルボニル還元酵素、その遺伝子、およびその利用法

技術分野

本発明は、新規ポリペプチド、該ポリペプチドをコードする遺伝子、該ポリペプチドを発現するための発現ベクター、該発現ベクターを用いて宿主を形質転換して得られた形質転換体、および該形質転換体を用いた、医薬等の合成原料として有用な化合物の製造方法に関する。

より詳細には、本発明は、N-ベンジル-3-ピロリジノンを実質的に還元して(S)-N-ベンジル-3-ピロリジノールを生成する酵素活性を持つ微生物より単離された、該酵素活性を有するポリペプチド、該ポリペプチドをコードするDNA、該DNAを含む発現ベクター、および該発現ベクターで形質転換された形質転換体に関する。本発明はまた、(S)-N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法に関する。

(S)-N-ベンジル-3-ピロリジノールは β -ラクタム系抗生物質やジヒドロピリジン系化合物等の医薬品の合成中間体として有用な化合物である。

背景技術

光学活性(S)-N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法としては、光学活性な化合物から合成する方法や、プロキラルな化合物から出発して不斉合成または光学分割する方法が知られている。このような方法として、特開平6-141376号公報には、N-ベンジル-3-ピロリジノンを立体選択的に還元する活性を有する酵素の存在下、このN-ベンジル-3-ピロリジノンを立体選択的に還元して光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールを製造する方法が開示されている。また、特開平10-150997号公報には、N-ベンジル-3-ピロリジノンに微生物の菌体、培養物又はそれらの処理物を作用させて光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールを製造する方法が開示されている。しかしながら、これらの方法はその基質仕込み濃度および基質から生成物への転換率が低く、実用に耐えるものではなかった。

発明の要約

本発明者らは、N-ベンジル-3-ピロリジノンに不斉的に還元し、(S)-N-ベンジル-3-ピロリジノールを生成する微生物由来のポリペプチドを見出し、(S)-N-ベンジル-3-ピロリジノールを効率良く製造することが可能であることを見出して本発明を完成するに至った。

本発明は、N-ベンジル-3-ピロリジノンを不斉的に還元して、(S)-N-ベンジル-3-ピロリジノールを生成し得るポリペプチドを提供することを課題とする。さらに、本発明は、遺伝子組換え技術を利用して該ポリペプチドを効率よく生産することを課題とする。また、本発明は、該ポリペプチドとグルコース脱水素酵素活性を有するポリペプチドを同時に高生産する形質転換体を提供し、さらに、該形質転換体を用いた実用的な(S)-N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法を提供することを課題とする。

すなわち本発明は、以下の(1)から(5)の理化学的性質を有するポリペプチドである：

(1) 作用：NADPHを補酵素として、N-ベンジル-3-ピロリジノンを不斉的に還元して(S)-N-ベンジル-3-ピロリジノールを生成する、

(2) 作用至適pH：4.5から5.5、

(3) 作用至適温度：40℃から45℃、

(4) 分子量：ゲル濾過分析において約29000、SDSポリアクリルアミド電気泳動分析において約35000、

(5) 阻害剤：二価銅イオンにより阻害される。

また本発明は、以下の(a)又は(b)のポリペプチドである：

(a) 配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド：

(b) 配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が置換、挿入、欠失および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつN-ベンジル-3-ピロリジノンを不斉的に還元して(S)-N-ベンジル-3-ピロリジノールを生成する酵素活性を有するポリペプチド。

さらに本発明は、これらポリペプチドをコードするDNAである。または、N

- ーベンジル-3-ピロリジノン)を不斉的に還元して (S)-N-ベンジル-3-ピロリジノールを生成する酵素活性を有するポリペプチドをコードするDNAであって、配列表の配列番号2で示される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであるか、または、N-ベンジル-3-ピロリジノンを不斉的に還元して (S)-N-ベンジル-3-ピロリジノールを生成する酵素活性を有するポリペプチドをコードするDNAであって、配列表の配列番号2で示される塩基配列と少なくとも60%の配列同一性を有するDNAでもある。

- さらには、これらDNAを含む発現ベクター、およびこのような発現ベクターを含む形質転換体でもある。

また本発明は、これら形質転換体および/またはそれらの処理物を、N-ベンジル-3-ピロリジノンと反応させる工程、並びに、生成した (S)-N-ベンジル-3-ピロリジノールを採取する工程からなる、(S)-N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法でもある。

15

発明の詳細な開示

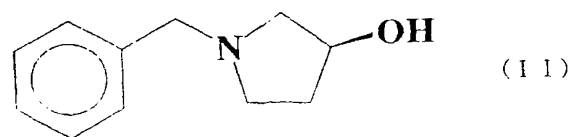
以下に本発明を詳述する。

まず、本発明のポリペプチドについて説明する。

- 本発明のポリペプチドは、以下の式 (I) で表されるN-ベンジル-3-ピロリジノンを不斉的に還元して、以下の式 (I I) で表される (S)-N-ベンジル-3-ピロリジノールを生成する酵素活性を有するものである。



N-ベンジル-3-ピロリジノン



(S)-N-ベンジル-3-ピロリジノール

このようなポリペプチドとして、以下の(1)から(5)の理化学的性質を有する酵素を挙げることができる。

(1) 作用：NADPHを補酵素として、N-ベンジル-3-ピロリジノン在不斉的に還元して(S)-N-ベンジル-3-ピロリジノールを生成する、

5 (2) 作用至適pH：4.5から5.5、

(3) 作用至適温度：40℃から45℃、

(4) 分子量：ゲル濾過分析において約29000、SDSポリアクリルアミド電気泳動分析において約35000、

(5) 阻害剤：二価銅イオンにより阻害される。

10 本発明において、ポリペプチドの酵素活性は、100mMリン酸緩衝液(pH 6.5)に、基質N-ベンジル-3-ピロリジノン1mM、補酵素NADPH 0.167mMおよび酵素を添加し、30℃で波長340nmの吸光度の減少を測定することにより実施する。

15 該ペプチドの作用至適pH、作用至適温度は、例えば、上述の還元活性測定系の反応pH、反応温度を変えて還元活性を測定することによって決定する。

該ペプチドのゲル濾過分析による分子量は、ゲル濾過において標準タンパク質の相対溶出時間から算出することにより決定する。また、SDSポリアクリルアミド電気泳動分析による分子量は、SDSポリアクリルアミド電気泳動において標準タンパク質の相対移動度から算出することにより決定する。

20 阻害剤は、例えば、上述の還元活性測定系に種々の化合物を添加して還元活性を測定することによって決定する。

本発明のポリペプチドは、N-ベンジル-3-ピロリジノン在不斉的に還元して(S)-N-ベンジル-3-ピロリジノールを生成する活性を有する微生物から取得することができる。従って、ポリペプチドの起源として用いられる微生物
25 は特に限定されないが、例えばマイクロコッカス(Micrococcus)属に属する微生物が挙げられ、特に好ましいものとしてはマイクロコッカス・ルテウス(Micrococcus luteus)IFO13867株を挙げることができる。本発明のポリペプチドを生産する微生物は、野生株または変異株のいずれでもあり得る。あるいは、細胞融合または遺伝子操作などの遺伝学的手法によ

- り誘導された微生物も用いられ得る。遺伝子操作された本発明のポリペプチドを生産する微生物は、例えば、これらの酵素を単離および/または精製して酵素のアミノ酸配列の一部または全部を決定する工程、このアミノ酸配列に基づいて該酵素をコードする塩基配列を決定する工程、このアミノ酸配列に基づいて該酵素をコードする塩基配列を得る工程、および、この塩基配列を他の微生物に導入して組換え微生物を得る工程からなる方法により得られ得る。

本発明のポリペプチドを生産する微生物のための培養培地としては、その微生物が増殖する限り、通常の、炭素源、窒素源、無機塩類、有機栄養素などを含む液体栄養培地が用いられ得る。

- 10 本明細書で用いられる用語「微生物の培養物」は、微生物の菌体または菌体を含む培養液を意味し、そして「その処理物」は、微生物の菌体または菌体を含む培養液から抽出または精製などの処理を行って得られた抽出物または精製物を意味する。

- 本発明のポリペプチドを生産する微生物からの該ポリペプチドの精製は、常法により行い得る。例えば、該微生物の菌体を適当な培地で培養し、培養液から遠心分離により菌体を集める。得られた菌体を例えば、超音波破碎機などで破碎し、遠心分離にて菌体残渣を除き、無細胞抽出液を得る。この無細胞抽出液に、例えば、塩析（硫酸アンモニウム沈殿、リン酸ナトリウム沈殿など）、溶媒沈殿（アセトンまたはエタノールなどによる蛋白質分画沈殿法）、透析、ゲル濾過、イオン交換、逆相等のカラムクロマトグラフィー、限外濾過等の手法を単独で、または組み合わせて用いて、ポリペプチドが精製され得る。

本発明のポリペプチドは、上述のように微生物から取得する天然酵素であってもよいし、組換え酵素であってもよい。天然酵素としては、配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドが挙げられる。

- 25 また、本発明のポリペプチドは、配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が置換、挿入、欠失および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつN-ベンジル-3-ピロリジノンを不斉的に還元して(S)-N-ベンジル-3-ピロリジノールを生成する酵素活性を有するポリペプチドであってもよい。

このようなポリペプチドは、配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドから、Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, Inc., 1989)等に記載の公知の方法に準じて調製することができる。

- 5 ここで、「N-ベンジル-3-ピロリジノン」を不斉的に還元して(S)-N-ベンジル-3-ピロリジノールを生成する酵素活性を有する」とは、上述のような還元活性測定条件下でN-ベンジル-3-ピロリジノンと反応させた場合に、配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを用いた場合の10%以上、好ましくは40%以上、さらに好ましくは60%以上の収率で(S)-N-ベンジル-3-ピロリジノールを生成することをいう。

次に、本発明のDNAについて説明する。

- 本発明のDNAとしては、上記のようなポリペプチドをコードするDNAであればよい。配列表の配列番号2で示される塩基配列からなるDNAであってもよいし、N-ベンジル-3-ピロリジノン」を不斉的に還元して(S)-N-ベンジル-3-ピロリジノールを生成する酵素活性を有するポリペプチドをコードし、かつ、配列表の配列番号2で示される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであってもよい。

- 「配列表の配列番号2で示される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA」とは、配列表の配列番号2で示される塩基配列からなるDNAをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法、あるいはサザンハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味する。具体的には、コロニーあるいはブランク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7~1.0MのNaCl存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2倍濃度のSSC溶液(1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウムよりなる)を用い、65℃の条件下でフィルターを洗淨することにより同定できるDNAを挙げることができる。

ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning, A laboratory manual, second edition (Cold

Spring Harbor Laboratory Press, 1989)
等に記載されている方法に準じて行うことができる。

- また、本発明のDNAは、N-ベンジル-3-ピロリジノンに不斉的に還元して (S)-N-ベンジル-3-ピロリジノールを生成する酵素活性を有するポリペプチドをコードし、かつ、配列表の配列番号2で示される塩基配列と、少なくとも60%の配列同一性、好ましくは少なくとも80%の配列同一性、より好ましくは少なくとも90%の配列同一性、さらに好ましくは少なくとも95%の配列同一性、最も好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するDNAであってもよい。
- 用語「配列同一性」は、対比される2つの塩基配列が同一であることを意味し、対比される2つの塩基配列間の配列同一性の割合(%)は、対比される2つの塩基配列を最適に整列させた後、同一の核酸塩基(例えば、A、T、C、G、U、またはI)が両方の配列で生じて適合した位置の数を取得し、適合した位置の数を比較塩基総数で除し、そして、この結果に100を乗じて計算される。配列同一性は、例えば、以下の配列分析用ツールを用いて算出し得る：UnixベースのGCG Wisconsin Package (Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8, 1994年9月, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, Wisconsin, USA 53711; Rice, P. (1996) Program Manual for ECG Package, Peter Rice, The Sanger Centre, Hinxton Hall, Cambridge, CB10 1RQ, England) および the ExPASy World Wide Web 分子生物学用サーバー (Geneva University Hospital and University of Geneva, Geneva, Switzerland)。

本発明のDNAは、N-ベンジル-3-ピロリジノンに不斉的に還元して (S)-N-ベンジル-3-ピロリジノールを生成する酵素活性を有する微生物より取得することができる。該微生物として、例えばマイクロコッカス (Micrococcus)

occus) 属に属する微生物が挙げられ、特に好ましいものとしてはマイクロコッカス・ルテウス (Micrococcus luteus) IFO13867 株を挙げることができる。

以下に、N-ベンジル-L-プロリンを不斉的に還元して (S)-N-ベンジル-L-プロリンを生成する酵素活性を有する微生物より、本発明の DNA を取得する方法の例を記載する。

まず、精製した該ポリペプチド、および該ポリペプチドを適当なエンドペプチダーゼで消化することにより得られるペプチド断片の部分アミノ酸配列を、エドマン法により決定する。そして、このアミノ酸配列情報をもとに DNA プライマーを合成する。次に、該 DNA の起源となる微生物より、通常の DNA 単離法、例えば、Murray 等の方法 (Nucleic Acids Res. 8:4321-4325 (1980)) により、該微生物の染色体 DNA を調製する。この染色体 DNA を鋳型として、先述の DNA プライマーを用いて PCR を行い、該ポリペプチド遺伝子の一部を増幅する。さらに、ここで増幅された該ポリペプチド遺伝子の一部を通常用いられる方法、例えばランダムプライムラベリング法 (Anal. Biochem., 132, 6 (1983)) で標識し、DNA プロブを調製する。該微生物の染色体 DNA を適当な制限酵素により切断し、該制限酵素切断断片をベクターに組み込み、これを適当な宿主細胞に導入することにより、該微生物染色体の DNA ライブラリーを構築する。先述の DNA プロブを用いて、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランクハイブリダイゼーション法等により、この DNA ライブラリーのスクリーニングを行い、該ポリペプチド遺伝子を含む DNA を得ることができる。このようにして得られた該ポリペプチド遺伝子を含む DNA 断片の塩基配列は、ジデオキシ・シーケンス法、ジデオキシ・チェーン・ターミネーション法などにより決定することができる。

例えば、ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer 社製) および ABI 373A DNA Sequencer (Perkin Elmer 社製) を用いて行われ得る。

次に、本発明の発現ベクター及び形質転換体について説明する。

本発明のDNAをベクターに組み込み、これを宿主内に導入してなる形質転換体内で酵素遺伝子を発現させることができる。このために用いられるベクターとしては、適当な宿主内で該酵素遺伝子を発現できるものであればいずれもが用いられ得る。このようなベクターとしては、例えば、プラスミドベクター、ファージベクター、コスミドベクターなどが挙げられる。また、他の宿主株との間で遺伝子交換が可能なシャトルベクターであってもよい。このようなベクターは、通常、*lacUV5*プロモーター、*trp*プロモーター、*trc*プロモーター、*tac*プロモーター、*lpp*プロモーター、*tufB*プロモーター、*recA*プロモーター、*pL*プロモーター等の制御因子を含み、本発明のDNAと作動可能に連結された発現単位を含む発現ベクターとして好適に用いられ得る。

本願明細書で用いる用語「制御因子」は、機能的プロモーターおよび、任意の関連する転写要素（例えば、エンハンサー、CCAATボックス、TATAボックス、SPI部位など）を有する塩基配列をいう。

本願明細書で用いる用語「作動可能に連結」は、遺伝子が発現するように、DNAと、その発現を調節するプロモーター、エンハンサー等の種々の調節エレメントとが宿主中で作動し得る状態で連結されることをいう。制御因子のタイプおよび種類が、宿主に応じて変わり得ることは、当業者に周知の事項である。

本発明のDNAを含む発現ベクターを導入する宿主としては、細菌、酵母、糸状菌、植物細胞、動物細胞などがあげられるが、大腸菌が特に好ましい。本発明のDNAは常法により宿主に導入され得る。宿主として大腸菌を用いる場合、例えば塩化カルシウム法により、本発明のDNAを導入することができる。

本発明のDNAを用いてN-ベンジルー3-ピロリジノンに不斉的に還元して(S)-N-ベンジルー3-ピロリジノールを生産する場合、NADPH、NADH等の補酵素が必要となる。しかし、酸化された該補酵素を還元型に変換する能力（以後、補酵素再生能と呼ぶ）を有する酵素をその基質とともに、つまり補酵素再生系を本発明のポリペプチドと組み合わせて反応を行うことにより、高価な補酵素の使用量を大幅に削減することができる。補酵素再生能を有する酵素としては、例えば、ヒドロクサナーゼ、キ酸脱水素酵素、アルコール脱水素酵素、アルデヒド脱水素酵素、グルコース-6-リン酸脱水素およびグルコース脱水素酵

素などを用いることが出来る。好適には、グルコース脱水素酵素が用いられる。

このような反応は、補酵素再生系を不斉還元反応系内に添加することによっても行われ得るが、本発明のDNA及びグルコース脱水素酵素活性を有するポリペプチドをコードするDNAの両者を含む形質転換体を用いた場合、補酵素再生能
5 を有する酵素を別に調製し反応系内に添加することなしに、該反応を効率良く実施し得る。このような形質転換体は、本発明のDNA及びグルコース脱水素酵素活性を有するポリペプチドをコードするDNAを、同一のベクターに組み込み、これを宿主に導入することにより得られるし、また、これら2種のDNAを不適合性グループの異なる2種のベクターにそれぞれ組み込み、それらを同一の宿主に
10 導入することによっても得られる。すなわち、本発明のDNAとグルコース脱水素酵素活性を有するポリペプチドをコードするDNAとを含む発現ベクターを含む形質転換体や、本発明のDNAを含む第一の発現ベクターと、グルコース脱水素酵素活性を有するポリペプチドをコードするDNAを含む発現ベクターとの両方を含む形質転換体を使用できる。グルコース脱水素酵素活性を有するポリペ
15 チドとしては、バシラス・メガテリウム (*Bacillus megaterium*) 由来のものが好ましい。

形質転換体中のグルコース脱水素酵素活性は、1Mトリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) に、基質グルコース0.1M、補酵素NADP 2mMおよび酵素を添加し、25℃で波長340nmの吸光度の増加を測定することにより実施する。

20 次に、本発明の形質転換体を用いた (S) -N-ベンジル-3-ピロリジノールの生産について説明する。

このような製造方法は、上記形質転換体および/またはそれらの処理物を、N-ベンジル-3-ピロリジノンと反応させる工程、および、生成した (S) -N-ベンジル-3-ピロリジノールを採取する工程からなる。

25 以下、具体的に説明する。まず最初に、適当な溶媒中に基質N-ベンジル-3-ピロリジノン、NADPH等の補酵素、および該形質転換体の培養物および/またはその処理物等を添加し、pH調整下、攪拌して反応させる。この反応は10℃～70℃の温度で行われ、反応中反応液のpHは4～10に維持する。反応はバッチ方式あるいは連続方式で行われ得る。バッチ方式の場合、反応基質は0.

- 1%から70% (w/v) の仕込み濃度で添加される。ここで形質転換体の処理物等とは、例えば、粗抽出液、培養菌体、凍結乾燥生物体、アセトン乾燥生物体、あるいはそれらの磨砕物等を意味する。さらにそれらは、酵素自体あるいは菌体のまま公知の手段で固定化されて用いられ得る。また、本反応は、補酵素再生系の存在下で行うことが好ましい。例えば、本反応を行う際、形質転換体として本発明のポリペプチドとグルコース脱水素酵素の両者を生産するものを用いる場合、反応系にさらにグルコースを添加することにより、補酵素の使用量を大幅に減らすことが可能である。

- 反応で生じた (S)-N-ベンジル-3-ピロリジノールは常法により採取され得る。例えば、必要に応じ遠心分離、濾過などの処理を施して菌体等の懸濁物を除去した後、水酸化ナトリウム等を添加し反応液を塩基性にし、酢酸エチル、トルエン等の有機溶媒で抽出した後、有機溶媒を減圧下で除去する。さらに蒸留またはクロマトグラフィー等の処理を行うことにより、精製され得る。

- 本反応において、基質となるN-ベンジル-3-ピロリジノン¹は、例えば、特開昭54-16466号公報に記載の方法で調製され得る。

- N-ベンジル-3-ピロリジノン、(S)-N-ベンジル-3-ピロリジノールの定量は、ガスクロマトグラフィー（カラム：Unipor t B 10%PEG-20M (3.0mm I D × 1.0m)、カラム温度：200℃、キャリアガス：窒素、検出：FID）で行い得る。また、(S)-N-ベンジル-3-ピロリジノールの光学純度の測定は、高速液体クロマトグラフィー（カラム：Chiralcel OB（ダイセル化学工業社製）、溶離液：n-ヘキサン/イソプロパノール/ジエチルアミン=950/50/1、流速：1ml/min、検出：254nm）で行い得る。

- 以上のように、本発明に従えば、本発明に含まれるポリペプチドの効率的生産が可能であり、それを利用することにより、(S)-N-ベンジル-3-ピロリジノールの優れた製造法が提供される。

図面の簡単な説明

図1は、実施例3で決定したDNAの塩基配列および推定アミノ酸配列を示す

図である。

図2は、実施例7の組換えプラスミドpTSBG1の作製方法及びその構造を示す図である。

5 発明を実施するための最良の形態

以下、実施例で本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらにより限定されるものではない。

以下の実施例において用いた組換えDNA技術に関する詳細な操作方法などは、次の成書に記載されている。

- 10 Molecular Cloning 2nd Edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)
Current Protocols in Molecular Biology (Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience)

15

(実施例1：酵素の精製)

以下の方法に従って、マイクロコッカス・ルテウス (*Micrococcus luteus*) IFO13867株よりN-ベンジル-3-ピロリジノンを経過的に還元して (S)-N-ベンジル-3-ピロリジノールを生成する活性を有する

20 酵素を単一に精製した。

(マイクロコッカス・ルテウス (*Micrococcus luteus*) IFO13867株の培養)

25 2L容坂口フラスコに下記の組成からなる液体培地400mlを調製し、120℃で20分間蒸気殺菌をおこなった。

培地組成：

トリプトン	1.6% (w/v)
イーストエキス	1.0% (w/v)
NaCl	0.5% (w/v)

水道水

pH 7. 0

- この培地に、予め同培地にて前培養しておいたミクロコッカス・ルテウス (*Micrococcus luteus*) 1FO13867株の培養液を1mlずつ
- 5 接種し、30℃で50時間振とう培養した。

(無細胞抽出液の調製)

- 上記の培養液2Lから遠心分離により菌体を集め、生理食塩水にて菌体を洗浄した。このようにして、該菌株の湿菌体42gを得た。この湿菌体を170ml
- 10 の100mMリン酸緩衝液 (pH 7. 0) に懸濁した後、2-メルカプトエタノールおよびフッ化フェニルメチルスルホニルをそれぞれ終濃度5mMおよび0.1mMとなるよう添加し、菌体をSONIFIRE 250 (BRANSON社製) を用いて超音波破碎した。この菌体破碎物から遠心分離にて菌体残渣を除き、無細胞抽出液180mlを得た。

15

(硫酸アンモニウム分画)

- 上記で得た無細胞抽出液に40%飽和となるように硫酸アンモニウムを添加、溶解し、生じた沈殿を遠心分離により除去した (この際無細胞抽出液のpHをアンモニア水でpH 7. 0に維持しながら行った)。先と同様pH 7. 0を維持し
- 20 ながら、この遠心上清に65%飽和となるようさらに硫酸アンモニウムを添加、溶解し、生じた沈殿を遠心分離により集めた。この沈殿を5mMの2-メルカプトエタノールを含む10mMリン酸緩衝液 (pH 7. 0) に溶解し、同一緩衝液で1夜透析した。

25 (Phenyl sepharoseカラムクロマトグラフィー)

- 上記で得られた粗酵素液に終濃度1Mとなるよう硫酸アンモニウムを溶解し (この際粗酵素液のpHをアンモニア水でpH 7. 0に維持しながら行った)、5mMの2-メルカプトエタノールおよび1Mの硫酸アンモニウムを含む10mMリン酸緩衝液 (pH 7. 0) で予め平衡化したPhenyl sepharose

e CL-4B (Pharmacia Biotech社製) カラム (130ml) に供し、酵素を吸着させた。同一緩衝液でカラムを洗浄した後、硫酸アンモニウム (1Mから0Mまで) のリニアグラジエントにより活性画分を溶出させた。活性画分を集め、5mMの2-メルカプトエタノールを含む10mMリン酸緩衝液 (pH 7.0) にて1夜透析を行った。

(DEAE sepharose カラムクロマトグラフィー)

上記で得られた粗酵素液を、5mMの2-メルカプトエタノールを含む10mMリン酸緩衝液 (pH 7.0) で予め平衡化したDEAE sepharose CL-4B (Pharmacia Biotech社製) カラム (20ml) に供し、酵素を吸着させた。同一緩衝液でカラムを洗浄した後、NaCl (0Mから1.0Mまで) のリニアグラジエントにより活性画分を溶出させた。活性画分を集め、5mMの2-メルカプトエタノールを含む10mMリン酸緩衝液 (pH 7.0) にて1夜透析を行った。

15

(Blue sepharose カラムクロマトグラフィー)

上記で得られた粗酵素液を、5mMの2-メルカプトエタノールを含む20mMリン酸緩衝液 (pH 6.0) で予め平衡化したBlue sepharose CL-6B (Pharmacia Biotech社製) カラム (10ml) に供し、酵素を吸着させた。同一緩衝液でカラムを洗浄した後、NaCl (0Mから0.5Mまで) のリニアグラジエントにより活性画分を溶出させた。活性画分を集め、5mMの2-メルカプトエタノールを含む10mMリン酸緩衝液 (pH 7.0) にて1夜透析を行った。

25 (ゲル濾過)

上記で得られた粗酵素液を、5mMの2-メルカプトエタノールおよび100mMの硫酸ナトリウムを含む100mMリン酸緩衝液 (pH 7.0) で予め平衡化したTSK-GEL G3000 SWXLカラム (東ソー株式会社製) に供し、同一緩衝液で活性画分を溶出させた。活性画分を集め、5mMの2-メルカ

プトエタノールを含む10mMリン酸緩衝液(pH7.0)にて1夜透析を行い、電気泳動的に単一の精製酵素標品を得た。以後、この酵素をBRDと呼ぶことにする。

5 (実施例2：酵素の性質の測定)

得られた酵素の酵素学的性質について検討した。酵素活性の測定は、基本的には、100mMリン酸緩衝液(pH6.5)に、基質N-ベンジル-3-ピロリジノン1mM、補酵素NADPH0.167mMおよび酵素を添加し、30℃で1分間反応させ、波長340nmの吸光度の減少を測定することにより行った。

10

(1) 作用：

NADPHを補酵素として、N-ベンジル-3-ピロリジノンに作用し、99%以上の光学純度で(S)-N-ベンジル-3-ピロリジノールを生成した。

(2) 作用至適pH：

15 緩衝液としてリン酸緩衝液および酢酸緩衝液を用いて、pH4.0~7.0の範囲で、上記方法で酵素活性を測定した。その結果、N-ベンジル-3-ピロリジノンに作用する至適pHは4.5~5.5であった。

(3) 作用至適温度：

20 20℃~60℃の温度で、N-ベンジル-3-ピロリジノンを基質とした場合の本酵素の活性を、1分間の反応で測定した。その結果、至適温度は40℃~45℃であった。

(4) 分子量：

25 ゲル濾過による本酵素の分子量の測定は、TSK-GEL G3000 SW XLカラム(東ソー株式会社製)を、溶離液としては5mMの2-メルカプトエタノールおよび100mMの硫酸ナトリウムを含む100mMリン酸緩衝液(pH7.0)を用いた。酵素のサブユニットの分子量はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により、標準タンパク質の相対移動度から算出した。その結果、本酵素の分子量はゲル濾過分析において約29000、SDSポリアクリルアミド電気泳動分析において約35000であった。

(5) 阻害剤：

表 1 に示す各種金属イオン、阻害剤を添加して反応を行い、無添加の場合の活性を 100% として、それらを添加した際の相対活性を調べた。表 1 に示す様に本酵素は二価銅イオンによって阻害を受けた。

5

表 1

化合物	添加濃度 相対活性	
	(mM)	(%)
無添加	—	100
CoCl ₂	1	99
CuSO ₄	0.1	6
	1	5
ZnSO ₄	1	99
MnCl ₂	1	89
MgSO ₄	1	99
1,10-フェナントロリン	1	90
5,5-ジフェニルヒダントイン	0.5	99
EDTA	1	88
PMSF	1	89
PCMB	0.1	78
DTNB	0.01	93
ヨード酢酸	1	89
NEM	1	94
クエルセチン	0.01	94

(実施例 3：BRD 遺伝子のクローニング)

10 (合成オリゴヌクレオチドプローブの作成)

実施例 1 で得られた精製 BRD を牛脾臓由来のトリプシン（和光純薬工業株式会社製）で消化し、得られたペプチド断片のアミノ酸配列を ABI 492 型プロテインシーケンサー（パーキンエルマー社製）により決定した。このアミノ酸配列をもとに、配列表の配列番号 3 および配列番号 4 に示す 2 種の DNA プライマー

15 ーを常法に従って合成した。

(PCRによるBRD遺伝子の増幅)

ミクロコッカス・ルテウス (*Micrococcus luteus*) IFO13867株の培養菌体からMurray等の方法 (Nucleic Acids Res. 8:4321-4325 (1980)) に従って染色体DNAを抽出した。次に、上記で調製したDNAプライマーを用い、得られた染色体DNAを鋳型としてPCRを行ったところ、BRD遺伝子の一部と考えられる約250bpのDNA断片が増幅された。

10 (染色体DNAライブラリーの作成)

ミクロコッカス・ルテウス (*Micrococcus luteus*) IFO13867株の染色体DNAを制限酵素BamHIで完全消化した後、アカロースゲル電気泳動により分離した。次に、上記で得られた約250bpのDNA断片をプローブとして用い、サザン法 (J. Mol. Biol. 98:503 (1975)) により該染色体DNA消化物の解析を行った (DNAプローブの標識およびその検出はGene Imagesラベリング・検出システム (アマシャム株式会社製) を用いて行った)。その結果、約4.5kbのDNA断片が該DNAプローブとハイブリダイズすることが判った。

そこで、該消化物をアカロースゲル電気泳動により分離した後、4.3kbから6.2kbのDNA断片を回収した。これらのDNA断片をベクタープラスミドpUC19 (宝酒造株式会社製) のBamHI部位に挿入した後、大腸菌JM109株 (宝酒造株式会社製) に導入し、同菌株の染色体DNAライブラリーを作成した。

25 (染色体DNAライブラリーのスクリーニング)

上記で得られたDNA断片をプローブとして用い、コロニーハイブリダイゼーション法により上記で作成した染色体DNAライブラリーのスクリーニングを行った (DNAプローブの標識およびその検出はGene Imagesラベリング・検出システム (アマシャム株式会社製) を用い、実験手順も同システムの取

り扱い説明書に従った)。その結果、1個の陽性コロニーが得られた。そこで、この陽性コロニーから得られた約4.5 kbのDNAが挿入された組換えプラスミドpUC-BBをBRD遺伝子を含む染色体DNAクローンとして選択した。

5 (塩基配列の決定)

上記で得られた組換えプラスミドpUC-BBについて、種々の制限酵素を作用させた際に生じる消化断片の解析を行い、制限酵素切断地図を作成した。次に、この解析の際に得られた各種DNA断片をpUC19のマルチクローニングサイトに挿入した組換えプラスミドを構築した。これらの組換えプラスミドを用いて、
10 各々の挿入断片の塩基配列分析をABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer社製)およびABI 373A DNA Sequencer (Perkin Elmer社製)を用いて行い、目的遺伝子が含まれると予想される約1.4 kbのDNA断片の塩基配列を決定した。その
15 塩基配列を図1に示した。また、この塩基配列中の構造遺伝子部分については、その塩基配列から推定されるアミノ酸配列を図1中で塩基配列の下段に示した。このアミノ酸配列と、精製BRDのトリプシン消化断片の部分アミノ酸配列を比較した結果、精製BRDの部分アミノ酸配列は全て、塩基配列から推定されるアミノ酸配列中に存在し、その部分で完全に一致した(図1中のアミノ酸配列の下
20 線部分)。このことから、本遺伝子がBRD遺伝子であると判断した。

(実施例4: BRD遺伝子を含む組換えプラスミドの作製)

BRDの構造遺伝子の開始コドン部分にNdeI部位を付加し、さらに3'末端の直後に終止コドン(TAA)とEcoRI切断点を付加した二本鎖DNAを
25 以下の方法により取得した。実施例3で決定された塩基配列を基に、BRD遺伝子の開始コドン部分にNdeI部位を付加したN末端DNAプライマー、および同遺伝子の3'末端の直後に終止コドン(TAA)とEcoRI部位を付加したC末端DNAプライマーを合成した。これら2つのプライマーの塩基配列を配列表の配列番号5および配列番号6に示した。これら2つの合成DNAプライマー

を用い、実施例3で得たプラスミドpUC-BBを鋳型としてPCRにより二本鎖DNAを増幅した。得られたDNA断片をNde IおよびEco R Iで消化し、プラスミドpUCNT (WO 91/03613) のlacプロモーターの下流のNde I、Eco R I部位に挿入することにより、組換えプラスミドpNTBR
5 を得た。

(実施例5: BRD遺伝子上流へのShaine-Dalgarno配列の付加)

BRD遺伝子を大腸菌内で高発現させるため、実施例4で調製したプラスミド
10 pNTBR中の同遺伝子の開始コドンの上流に大腸菌のShaine-Dalgarno配列(9塩基)を新たに付加したプラスミドを以下のように取得した。
まず、PCR法により実施例4で使用した大腸菌発現ベクターpUCNTのNde I部位中のGをTに変換し、プラスミドpUCTを構築した。次に、配列表の配列番号2に示したBRD遺伝子の開始コドンから5塩基上流に大腸菌のShaine-Dalgarno配列(9塩基)を、さらにその直前にEco R I部位
15 を付加したN末端DNAプライマーと、同遺伝子の3'末端の直後にSac I部位を付加したC末端DNAプライマーを常法に従って合成した。これら2つのプライマーの塩基配列を配列表の配列番号7および配列番号8に示した。これら2つのDNAプライマーを用い、実施例4で構築したプラスミドpNTBRを鋳型
20 としてのPCRにより二本鎖DNAを合成した。得られたDNA断片をEco R IおよびSac Iで消化し、プラスミドpUCTのEco R I、Sac I部位(lacプロモーター下流)に挿入した組換えプラスミドpTBHを得た。

(実施例6: BRD遺伝子のGC比の低減)

25 さらにBRD遺伝子を大腸菌内で高発現させるため、実施例5で構築したプラスミドpTBH中の同遺伝子の1塩基目から118塩基目までを、そのコードするアミノ酸配列を変えずにGC比の小さいDNAに置き換えたプラスミドpTSBHを以下のように構築した。

常法に従い配列表の配列番号9に示した配列からなる2本鎖DNAを調製し、

これをEcoRIとXhoIで消化した後、同制限酵素による消化でpTBHから切り出されるBRD遺伝子の5'末端部分を含むDNA断片と入れ替えたプラスミドpTSBHを得た。

5 (実施例7：BRD遺伝子およびグルコース脱水素酵素遺伝子の両者を含む組換えプラスミドの作製)

バシラス・メガテリウム (*Bacillus megaterium*) IAM 1030株由来のグルコース脱水素酵素 (以後、GDHと呼ぶことにする) の遺伝子の開始コドンから5塩基上流に大腸菌のShaine-Dalgarno配列 (9塩基) を、さらにその直前にSacI切断点を、また、終止コドンの直後にBamHI切断点を付加した二本鎖DNAを、以下の方法により取得した。GDH遺伝子の塩基配列情報を基に、GDHの構造遺伝子の開始コドンから5塩基上流に大腸菌のShaine-Dalgarno配列 (9塩基) を、さらにその直前にSacI切断点を付加したN末端DNAプライマーと、GDHの構造遺伝子の終始コドンの直後にBamHI部位を付加したC末端DNAプライマーを常法に従って合成した。これら2つのプライマーの塩基配列を配列表の配列番号10および配列番号11に示した。これら2つのDNAプライマーを用い、プラスミドpGDK1 (Eur. J. Biochem. 186, 389 (1989)) を鋳型としてPCRにより二本鎖DNAを合成した。得られたDNA断片をSacIおよびBamHIで消化し、実施例5において構築したpTSBHのSacI、BamHI部位 (BRD遺伝子の下流に存在する) に挿入した組換えプラスミドpTSBG1を得た。pTSBG1の作製法および構造を図2に示す。

(実施例8：組換え大腸菌の作製)

25 実施例5、6および7で得た組換えプラスミドpTBH、pSTBHおよびpTSBG1を用いて大腸菌HB101 (宝酒造株式会社製) を形質転換し、組換え大腸菌HB101 (pTBH)、HB101 (pSTBH) およびHB101 (pTSBG1) を得た。こうして得られた形質転換体のうち、大腸菌HB101 (pSTBH) およびHB101 (pTSBG1) は、それぞれ、受託番号F

ERM BP-7118 (寄託日2000年4月11日) およびERM BP-7119 (寄託日2000年4月11日) として独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター (あて名: 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6) に寄託されている。

- 5 また、プラスミドpGDA2 (J. Biol. Chem., (1989), 264, 6381) をEcoRIおよびPstIで二重消化して得られる、*Bacillus megaterium* IWG3由来のGDH遺伝子を含む約0.9 kbのDNA断片を、プラスミドpSTV28 (宝酒造株式会社製) のEcoRI-PstI部位に挿入して、組換えプラスミドpSTVGを構築した。この
- 10 pSTVGで、予め塩化カルシウム法でコンピテント化しておいた大腸菌HB101 (pTSBH) を高い導入率で形質転換し、大腸菌HB101 (pTSBH, pSTVG) を容易に得た。

(実施例9: 組換え大腸菌におけるBRDの発現)

- 15 実施例8で得た組換え大腸菌HB101 (pTBH) およびHB101 (pTSBH) を200 μ g/mlのアンピシリンを含む2 \times YT培地で、28 $^{\circ}$ Cにおいて15時間振とう培養した。この前培養液1mlを、500ml容坂口フラスコ中でオートクレーブ滅菌したグリセリン1.5% (w/v), バクト・トリプトン1.5% (w/v), バクト・イーストエキス0.4% (w/v), 塩化ナ
- 20 トリウム0.2% (w/v), リン酸二水素カリウム0.8% (w/v), 硫酸マグネシウム七水和物0.05% (w/v), アデカノールLG109 (旭電化製) 0.033% (w/v) から成りpH6.0に調整した培地100mlに接種し、30 $^{\circ}$ Cで60時間振とう培養した。これらの本培養液から遠心分離機を用いて集菌後、この菌体を100mMリン酸緩衝液 (pH6.5) に懸濁し、超音
- 25 波破碎により無細胞抽出液を得た。

この無細胞抽出液のBRD活性を以下のように測定した。BRD活性の測定は、100mMリン酸緩衝液 (pH6.5) に、基質N-ベンジル-L-ピロリジノン1mM、補酵素NADPH0.167mMおよび酵素を添加し、30 $^{\circ}$ Cで波長340nmの吸光度の減少を測定することにより行った。この反応条件において、

1 分間に $1 \mu\text{mol}$ の NADPH を NADP に酸化する酵素活性を 1 unit と定義した。この様に測定した無細胞抽出液中の BRD 活性を比活性として表し、ベクタープラスミド pUCNT を保持する形質転換体と比較した。また、実施例 1 と同様の方法で調製したマイクロコッカス・ルテウス (*Micrococcus* 5 *luteus*) IFO 13867 株の無細胞抽出液中の BRD 活性についても同様に比較した。それらの結果を表 2 に示す。

表 2

菌株名	BRD比活性 (U/mg)
E. coli HB101 (pUCNT)	< 0.01
E. coli HB101 (pTBH)	0.06
E. coli HB101 (pTSBH)	0.61
Micrococcus luteus IFO 13867	0.06

10

大腸菌 HB101 (pTSBH) では、ベクタープラスミドのみの形質転換体である大腸菌 HB101 (pUCNT) と比較して明らかな BRD 活性の増加が見られ、マイクロコッカス・ルテウス (*Micrococcus luteus*) IFO 13867 株と比較して約 10 倍の活性が得られた。

15

(実施例 10 : 組換え大腸菌における BRD および GDH の同時発現)

実施例 8 で得た組換え大腸菌 HB101 (pTSBG1) および HB101 (pTSBH, pSTVG) を実施例 9 と同様に培養、処理して得られる無細胞抽出液の GDH 活性を、以下のように測定した。GDH 活性の測定は 1 M トリス塩 20 酸緩衝液 (pH 8.0) に、基質グルコース 0.1 M、補酵素 NADP 2 mM 及び酵素を添加し、25℃ で波長 340 nm の吸光度の増加を測定することにより行った。この反応条件において、1 分間に $1 \mu\text{mol}$ の NADP を NADPH に還元する酵素活性を 1 unit と定義した。また、BRD 活性についても実施例 9 と同様に測定した。このように測定した無細胞抽出液中の BRD および GDH 25 活性を比活性として表し、大腸菌 HB101 (pTSBH) およびベクターのみ

の形質転換体HB101 (pUCNT) と比較した結果を表3に示す。

表3

菌株名	BRD比活性 (U/mg)	GDH比活性 (U/mg)
E. coli HB101 (pUCNT)	< 0.01	< 0.01
E. coli HB101 (pTSBH)	0.61	< 0.01
E. coli HB101 (pTSBG1)	0.52	89
E. coli HB101 (pTSBH, pSTVG)	0.69	3.2

5

大腸菌HB101 (pTSBG1) およびHB101 (pTSBH, pSTVG) では、ベクタープラスミドのみの形質転換体である大腸菌HB101 (pUCNT) と比較して、明らかなBRDおよびGDH活性の増加が見られた。

- 10 (実施例11: BRD遺伝子を導入した組換え大腸菌によるN-ベンジル-3-ピロリジノンからの(S)-N-ベンジル-3-ピロリジノールの合成)

実施例9で得られた組換え大腸菌HB101 (pTSBH) の培溶液を、SONIFIRE 250 (BRANSON社製) を用いて超音波破碎した。この菌体破碎液25mlにグルコース脱水素酵素(天野製薬株式会社製) 1350U、グルコース3.0g、NADP 3.0mg、N-ベンジル-3-ピロリジノン0.25gを添加した。この反応液を30℃で攪拌し、5Mの塩酸または水酸化ナトリウムでpH6.5に調整しつつ、1時間毎にN-ベンジル-3-ピロリジノンを0.25gずつ添加し、合計2.0gのN-ベンジル-3-ピロリジノンを添加した後、さらに20時間攪拌を続けた。反応終了後、この反応液に5Mの水酸化ナトリウム水溶液2.5mlを添加した後トルエンで抽出し、脱溶剤した後抽出物の分析を行ったところ、収率74%でN-ベンジル-3-ピロリジノールが得られた。この際、生成したN-ベンジル-3-ピロリジノールは光学純度99% ee以上のS体であった。

25 N-ベンジル-3-ピロリジノンおよびN-ベンジル-3-ピロリジノールの定量は、ガスクロマトグラフィー(カラム: Unipore B 10% PEG-

20 M (3.0 mm ID × 1.0 m)、カラム温度: 200°C、キャリアガス: 窒素、検出: FID) により行った。また、(S)-N-ベンジル-3-ピロリジノールの光学純度の測定は、高速液体クロマトグラフィー (カラム: Chiralcel OB (ダイセル化学工業社製)、溶離液: n-ヘキサン/イソプロパノール/ジエチルアミン = 950/50/1、流速: 1 ml/min、検出: 254 nm) により行った。

(実施例 12: BRD および グルコース脱水素酵素を同時発現させた組換え大腸菌による N-ベンジル-3-ピロリジノンからの (S)-N-ベンジル-3-ピロリジノールの合成)

実施例 9 で得られた組換え大腸菌 HB101 (pTSBG1) の培養液 25 ml に、グルコース 2.5 g、NADP 3.0 mg、N-ベンジル-3-ピロリジノン 0.25 g を添加した。この反応液を 30°C で攪拌し、5 M の塩酸または水酸化ナトリウムで pH 6.5 に調整しつつ、2 時間毎に N-ベンジル-3-ピロリジノンを 0.25 g ずつ添加し、合計 1.0 g の N-ベンジル-3-ピロリジノンを添加した後、さらに 17 時間攪拌を続けた。反応終了後、この反応液に 5 M の水酸化ナトリウム水溶液 1.2 ml を添加した後トルエンで抽出し、脱溶剤した後抽出物の分析を行ったところ、収率 92% で N-ベンジル-3-ピロリジノールが得られた。この際、生成した N-ベンジル-3-ピロリジノールは光学純度 99% ee 以上の S 体であった。

(実施例 13: BRD および グルコース脱水素酵素を同時発現させた組換え大腸菌による N-ベンジル-3-ピロリジノンからの (S)-N-ベンジル-3-ピロリジノールの合成)

25 実施例 9 で得られた組換え大腸菌 HB101 (pTSBH、pSTVG) の培養液 25 ml に、グルコース 2.5 g、NADP 3.0 mg、N-ベンジル-3-ピロリジノン 0.25 g を添加した。この反応液を 30°C で攪拌し、5 M の塩酸または水酸化ナトリウムで pH 6.5 に調整しつつ、1 時間毎に N-ベンジル-3-ピロリジノンを 0.25 g ずつ添加し、合計 2.0 g の N-ベンジル-3-

ーピロリジノンに添加した後、さらに16時間撹拌を続けた。反応終了後、この反応液に5Mの水酸化ナトリウム水溶液2.5mlを添加した後トルエンで抽出し、脱溶剤した後抽出物の分析を行ったところ、収率93%でN-ベンジル-3-ピロリジノールが得られた。この際、生成したN-ベンジル-3-ピロリジノールは光学純度99%以上のS体であった。

産業上の利用可能性

N-ベンジル-3-ピロリジノンを不斉的に還元して(S)-N-ベンジル-3-ピロリジノールを生成する酵素活性を有するポリペプチド遺伝子のクローニング、および、その塩基配列の解析により、該ポリペプチド産生能の高い形質転換体を得ることが可能になった。また、該ポリペプチドおよびグルコース脱水素酵素を同時に高生産する能力を有する形質転換体をも得ることが可能になった。さらに、これらの形質転換体を用いることにより、N-ベンジル-3-ピロリジノンからの(S)-N-ベンジル-3-ピロリジノールの合成を効率良く行うことが可能となった。

請求の範囲

1. 以下の(1)から(5)の理化学的性質を有することを特徴とするポリペプチド:

- 5 (1) 作用: NADPHを補酵素として、N-ベンジル-3-ピロリジノンを不斉的に還元して(S)-N-ベンジル-3-ピロリジノールを生成する、
(2) 作用至適pH: 4.5から5.5、
(3) 作用至適温度: 40℃から45℃、
(4) 分子量: ゲル濾過分析において約29000、SDSポリアクリルアミド
10 電気泳動分析において約35000、
(5) 阻害剤: 二価銅イオンにより阻害される。

2. 以下の(a)又は(b)のポリペプチド:

- (a) 配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド:
15 (b) 配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、挿入、欠失および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつN-ベンジル-3-ピロリジノンを不斉的に還元して(S)-N-ベンジル-3-ピロリジノールを生成する酵素活性を有するポリペプチド。

- 20 3. ミクロコッカス(Micrococcus)属に属する微生物に由来する請求の範囲第1または2項に記載のポリペプチド。

4. 前記微生物が、ミクロコッカス・ルテウス(Micrococcus luteus)IFO13867株である請求の範囲第3項に記載のポリペプチド。

25

5. 請求の範囲第1から4項のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードするDNA。

6. N-ベンジル-3-ピロリジノンを不斉的に還元して(S)-N-ベンジ

ルー 3-ピロリジノールを生成する酵素活性を有するポリペプチドをコードする DNA であって、
配列表の配列番号 2 で示される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA。

5

7. N-ベンジル-3-ピロリジノン を不斉的に還元して (S)-N-ベンジル-3-ピロリジノールを生成する酵素活性を有するポリペプチドをコードする DNA であって、

配列表の配列番号 2 で示される塩基配列と少なくとも 60% の配列同一性を有す

10 る DNA。

8. 請求の範囲第 5、6 または 7 項に記載の DNA を含む発現ベクター。

9. プラスミド pTSBH である請求の範囲第 8 項記載の発現ベクター。

15

10. グルコース脱水素酵素活性を有するポリペプチドをコードする DNA をさらに含む請求の範囲第 8 項に記載の発現ベクター。

20

11. 前記グルコース脱水素酵素活性を有するポリペプチドが、バシラス・メガテリウム (*Bacillus megaterium*) 由来のグルコース脱水素酵素である請求の範囲第 10 項に記載の発現ベクター。

12. プラスミド pTSBG1 である請求の範囲第 11 項に記載の発現ベクター。

25

13. 請求の範囲第 8 から 12 項のいずれか 1 項に記載の発現ベクターを含む形質転換体。

14. 請求の範囲第 8 または 9 項に記載の発現ベクター、および、グルコース

脱水素酵素活性を有するポリペプチドをコードするDNAを含む発現ベクターの両方を含む形質転換体。

- 15 15. 前記グルコース脱水素酵素活性を有するポリペプチドが、バシラス・メガテリウム (*Bacillus megaterium*) 由来のグルコース脱水素酵素である請求の範囲第14項に記載の形質転換体。

16. 宿主が大腸菌である請求の範囲第13から15項のいずれか1項に記載の形質転換体。

10

17. *E. coli* HB101 (pTSBH) である請求の範囲第16項に記載の形質転換体。

- 15 18. *E. coli* HB101 (pTSBG1) である請求の範囲第16項に記載の形質転換体。

19. *E. coli* HB101 (pTSBH, pSTVG) である請求の範囲第16項に記載の形質転換体。

- 20 20. 請求の範囲第13から19項のいずれか1項に記載の形質転換体および/またはそれらの処理物を、N-ベンジル-3-ピロリジノンと反応させる工程、並びに、生成した (S)-N-ベンジル-3-ピロリジノールを採取する工程からなることを特徴とする、(S)-N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法。

25

21. 前記反応させる工程が、補酵素再生系の存在下で行われる請求の範囲第20項に記載の方法。

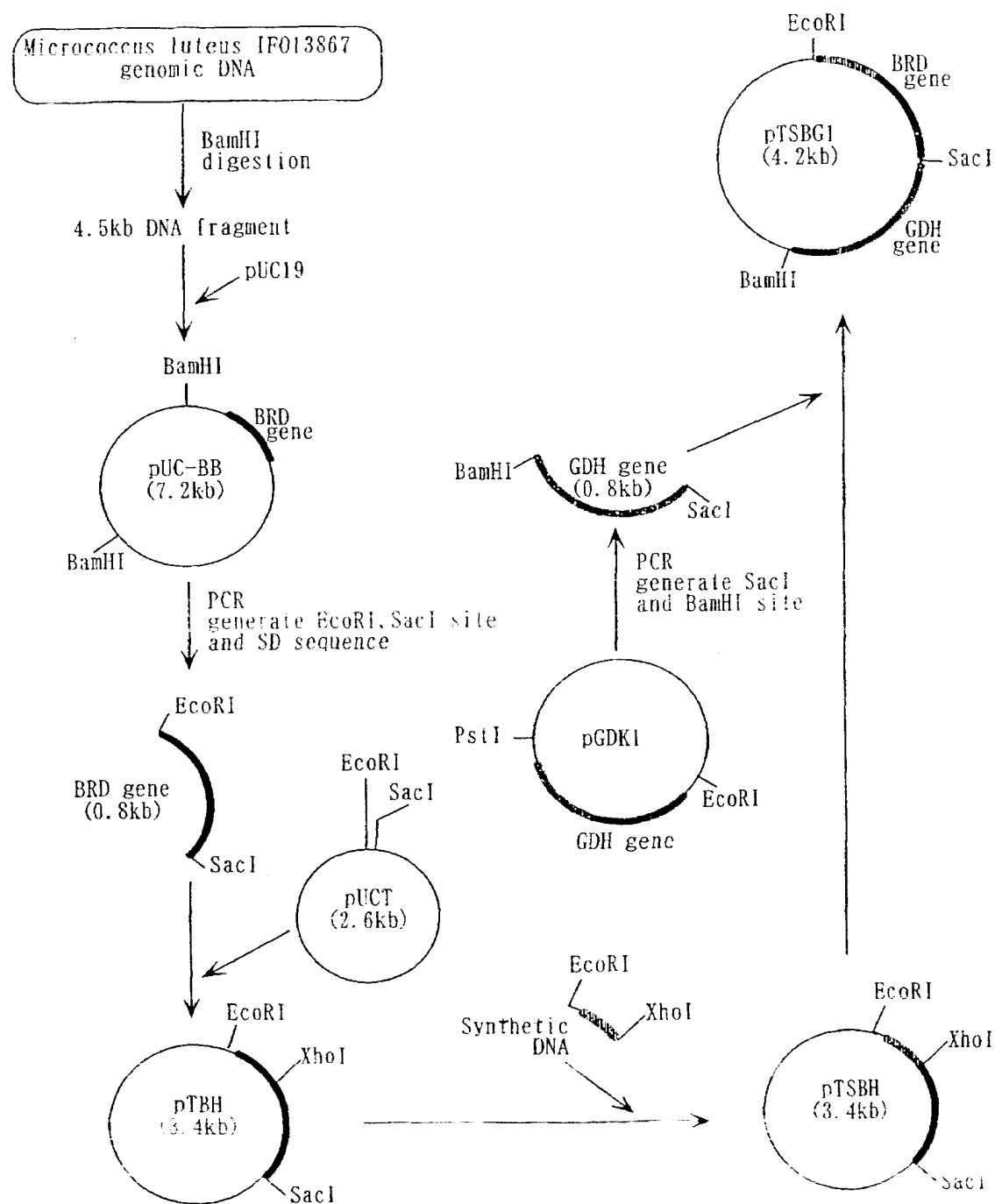
☒ 1

1 GGTACCCGCCGCCCTCCTATAAGCCAGCACCGGTGAGGACGCGCCGCCCTTCGAGGAT 61
61 CTCAGCCCACGTCCCGCCTCAGGACAACCAGAAGGAAGTGATCGCGGATGCGACGGATGA 121
M R R M T
121 CGCTGCCGAGTGGGGAGTCCATCCCTGTGCTGGGCCAGGGCACCTGGGGCTGGGGTGAAG 181
L P S G E S I P V L G Q G T W G W G E D
181 ACCCCGGCCGCCGCCGACGAGGTGCGCCGCTGCACGCCGCCCTCGAGCTGGGCATGA 241
P G R R G D E V A A L H A G L E L G M T
241 CGCTGGTGCACACCGCCGAGATGTACGCCGACGGCGGTGCGGAGGAGGTGGCTGGTGAAG 301
L V D T A E M Y A D G G A E E V A G E A
301 CATTGGCGGGTCCCGCGACGAGGCGTTCCGTGGTCAAGGTCATGCCGTCCCACGCCT 361
L A G R R D E A F V V S K V M P S H A S
361 CCCGTTCCGGCACGATCGCGCCTGCGAACGACGCTGAAACGCCTGGGCACCGATCGGA 421
R S G T I A A C E R S L K R L G T D R I
421 TCGACCTCTACCTGCTGCACTGGCAGGGCAGGTACCCGCTGCAGGACACCGTCGCGGCCT 481
D L Y L L H W Q G R Y P L Q D T V A A F
481 TCCACCAGCTCGTCGAGGACGGGAAAATCCGATACTGGGGCGTCAGCAACTTCGACCACC 541
H Q L V E D G K I R Y W G V S N F D H R
541 GGGCCCTCGCCGAGCTGCAGGACGTGCCGGGCACCAGCGGGCTGACCACGGATCAGGTGC 601
A L A E L Q D V P G T S G L T T D Q V L
601 TGTACAACTGTGCGGGCGAGGACCGGAGTACGACCTGCTGCCGTGGTGGCCGACCACC 661
Y N L S R R G P E Y D L L P W C A D H Q
661 AGCTGCCGGTTCATGGCGTACTCGCCGATCGAGCAGGGCCGCATCCTTGACGACACGACGC 721
L P V M A Y S P I E Q G R I L D D T T L
721 TGAACGACGTCCGGCCCCGTACAGCGTCAGCCCCGGCGGGCCCTTGCCTGGGTGC 781
N D V A A R H S V S P A A A A L A W V L
781 TGGCCGCGACTCGCTCTGCACGATCCCCAAGCGAGCAGCCCGCAGCACGTGCGCGACA 841
R R D S L C T I P K A S S P Q H V R D N
841 ACGCCACAGCACTGGACGTGGAGCTGACCCGGAAGACCTGGATGCTCTGGACCGTGCCT 901
A T A L D V E L T R E D L D A L D R A F
901 TTCCGCCCCGAGCGGACCGGACCACTGGAAATGCTGTGACCCTGCCCCAGGGCGCAGC 961
P P P S G P R P L E M L *
961 CCGGTCCGTCCGGGCGGTCCGGGCAGTCCGGGCAGCGCTCCGGTCAGCGCAAGTCTCCGA 1021
1021 AGGACCTGCCTGTCACCTCCTCCTGAACCTGTGCACGCCATCCATCGACTCCTTTCTCG 1081
1081 AGCCCTGTGGGTTTCGGGTAGGCGTGATCATCCGCTGGCAGGTCCCCAAGTGGCCTC 1141
1141 GAGCCGGGCCCTCTGCTTGTCCGTGAGCAACCCGGTTCCGGCGTGCAGGGTTCGACGGGC 1201
1201 GGAGTAGAGCGGGTCGCCCGTCCGGCCGCGGTGGCCATGCAGGTCCTGCTGGACCCGGCG 1261
1261 GTGGCAGCGGACCAACGCGTCGCCGGCTAACCGGACTGCGAGCGACCGCGTTGTGGACG 1321
1321 CAGACGACCTGGACACTGGGCCGTCCGGTCAGGAGGATCTCCAAAGTCGGCGCGGGGT 1381
1381 TCAGGCGATGTGAGGAAGGAACGGAGCTC 1410



2/2

図 2





Sequence Listing

<110> 鐘淵化学工業株式会社 Kaneka Corporation

<120> 新規カルボニル還元酵素、その遺伝子、およびその利用法

<130> T609HOP-GT

<150> JP2000-232756

<151> 2000-08-01

<160> 11

<210> 1

<211> 277

<212> PRT

<213> Micrococcus luteus

<400> 1

Met Arg Arg Met Thr Leu Pro Ser Gly Glu Ser Ile Pro Val Leu Gly
1 5 10 15

Gln Gly Thr Trp Gly Trp Gly Glu Asp Pro Gly Arg Arg Gly Asp Glu
20 25 30

Val Ala Ala Leu His Ala Gly Leu Glu Leu Gly Met Thr Leu Val Asp
35 40 45

Thr Ala Glu Met Tyr Ala Asp Gly Gly Ala Glu Glu Val Ala Gly Glu
50 55 60

Ala Leu Ala Gly Arg Arg Asp Glu Ala Phe Val Val Ser Lys Val Met
65 70 75 80

Pro Ser His Ala Ser Arg Ser Gly Thr Ile Ala Ala Cys Glu Arg Ser
85 90 95

Leu Lys Arg Leu Gly Thr Asp Arg Ile Asp Leu Tyr Leu Leu His Trp



100 105 110
Gln Gly Arg Tyr Pro Leu Gln Asp Thr Val Ala Ala Phe His Gln Leu
115 120 125
Val Glu Asp Gly Lys Ile Arg Tyr Trp Gly Val Ser Asn Phe Asp His
130 135 140
Arg Ala Leu Ala Glu Leu Gln Asp Val Pro Gly Thr Ser Gly Leu Thr
145 150 155 160
Thr Asp Gln Val Leu Tyr Asn Leu Ser Arg Arg Gly Pro Glu Tyr Asp
165 170 175
Leu Leu Pro Trp Cys Ala Asp His Gln Leu Pro Val Met Ala Tyr Ser
180 185 190
Pro Ile Glu Gln Gly Arg Ile Leu Asp Asp Thr Thr Leu Asn Asp Val
195 200 205
Ala Ala Arg His Ser Val Ser Pro Ala Ala Ala Ala Leu Ala Trp Val
210 215 220
Leu Arg Arg Asp Ser Leu Cys Thr Ile Pro Lys Ala Ser Ser Pro Gln
225 230 235 240
His Val Arg Asp Asn Ala Thr Ala Leu Asp Val Glu Leu Thr Arg Glu
245 250 255
Asp Leu Asp Ala Leu Asp Arg Ala Phe Pro Pro Pro Ser Gly Pro Arg
260 265 270
Pro Leu Glu Met Leu
275

<210> 2

<211> 834

<212> DNA



213 Micrococcus luteus

400 2

atg ega cgg atg acg ctg ccg agt ggg gag tcc atc cct gtg ctg ggc
Met Arg Arg Met Thr Leu Pro Ser Gly Glu Ser Ile Pro Val Leu Gly
1 5 10 15

cag ggc acc tgg ggc tgg ggt gag gac ccc ggc cgc cgc ggc gac gag
Gln Gly Thr Trp Gly Trp Gly Glu Asp Pro Gly Arg Arg Gly Asp Glu
20 25 30

gtc gcc gcg ctg cac gcc ggc ctc gag ctg ggc atg acg ctg gtc gac
Val Ala Ala Leu His Ala Gly Leu Glu Leu Gly Met Thr Leu Val Asp
35 40 45

acc gcc gag atg tac gcc gac ggc ggt gcg gag gag gtg gct ggt gaa
Thr Ala Glu Met Tyr Ala Asp Gly Gly Ala Glu Glu Val Ala Gly Glu
50 55 60

gca ttg gcg ggt cgc cgc gac gag gcg ttc gtg gtc agc aag gtc atg
Ala Leu Ala Gly Arg Arg Asp Glu Ala Phe Val Val Ser Lys Val Met
65 70 75 80

ccg tcc cac gcc tcc cgt tcc ggc acg atc gcg gcc tgc gaa cgc agc
Pro Ser His Ala Ser Arg Ser Gly Thr Ile Ala Ala Cys Glu Arg Ser
85 90 95

ctg aaa cgc ctg ggc acc gat cgg atc gac ctc tac ctg ctg cac tgg
Leu Lys Arg Leu Gly Thr Asp Arg Ile Asp Leu Tyr Leu Leu His Trp
100 105 110

cag ggc ags tac ccg ctg cag gac acc gtc gcg gcc ttc cac cag ctc
Gln Gly Arg Tyr Pro Leu Gln Asp Thr Val Ala Ala Phe His Gln Leu
115 120 125

gtc gag gac ggg aaa atc cga tac tgg ggc gtc agc aac ttc gac cac
Val Glu Asp Gly Lys Ile Arg Tyr Trp Gly Val Ser Asn Phe Asp His
130 135 140



egg gcc ctc gcc gag ctg cag gac gtg cgg ggc acc agc ggg ctg acc
Arg Ala Leu Ala Glu Leu Gln Asp Val Pro Gly Thr Ser Gly Leu Thr
145 150 155 160

acg gat cag gtg ctg tac aac ctg tgg cgg cga gga cgg gag tac gac
Thr Asp Gln Val Leu Tyr Asn Leu Ser Arg Arg Gly Pro Glu Tyr Asp
165 170 175

ctg ctg cgg tgg tgc gcc gac cac cag ctg cgg gtc atg gcg tac tgg
Leu Leu Pro Trp Cys Ala Asp His Gln Leu Pro Val Met Ala Tyr Ser
180 185 190

cgg atc gag cag ggc cgc atc ctt gac gac acg acg ctg aac gac gtc
Pro Ile Glu Gln Gly Arg Ile Leu Asp Asp Thr Thr Leu Asn Asp Val
195 200 205

ggg gcc cgt cac agc gtc agc ccc ggg ggg gcc ctt gcc tgg gtg
Ala Ala Arg His Ser Val Ser Pro Ala Ala Ala Ala Leu Ala Trp Val
210 215 220

ctg cgc cgc gac tgg ctc tgc acg atc ccc aag gcg agc agc cgg cag
Leu Arg Arg Asp Ser Leu Cys Thr Ile Pro Lys Ala Ser Ser Pro Gln
225 230 235 240

cac gtg cgc gac aac gcc aca gca ctg gac gtg gag ctg acc cgc gaa
His Val Arg Asp Asn Ala Thr Ala Leu Asp Val Glu Leu Thr Arg Glu
245 250 255

gac ctg gat gct ctg gac cgt ggg ttt cgg ccc cgg agc gga cgg cga
Asp Leu Asp Ala Leu Asp Arg Ala Phe Pro Pro Pro Ser Gly Pro Arg
260 265 270

cca ctg gaa atg ctg tga
Pro Leu Glu Met Leu
275



<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 3

gayaengeng aratgtaygc

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 4

tcytenacna gytgrtgraa

20

<210> 5

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 5

gcgcataatgc gacggaatgac gctgcc

26

<210> 6

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>



<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 6

ggcgaattct tacagcattt ccagtggteg cg

32

<210> 7

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 7

gcgaattcta aggagattta tatatgcgac ggaatgacgt gccgag

46

<210> 8

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 8

caggagctct tacagcattt ccagtggtc

29

<210> 9

<211> 144

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: double-stranded DNA

<400> 9

gaattictaag gagatttaca tatgcgtcgt atgactttac catctgggtga aictattcca 60
gttttaggtc aaggtacltg gggttgggst gaagatccag gtcgtcgtgg tgatgaagtt 120



getgctttac atgctggctt cgag

144

<210> 10

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 10

caggagctct aaggaggtta acaatgtata aag

33

<210> 11

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 11

cacggatcct tatccgcgtc ctgcttgg

28



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12N15/53, C12N9/02, C12N1/21, C12P17/10//
(C12N15/53, C12R1:265)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12N15/53, C12N9/02, C12N1/21, C12P17/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル (JOIS), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG),
MEDLINE (STN), EMBL/DDBJ/Genbank/PIR/Swissprot/Genbase

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 98/23769 A1 (KANEKA CORP.) 4. 6月. 1998 (04. 06. 98) & JP 10-150998 A	1-21
A	WO 98/23768 A1 (KANEKA CORP.) 4. 6月. 1998 (04. 06. 98) & JP 10-150997 A & EP 942068 A & CN 1238808 A & US 6214610 A & KR 2000057221 A	1-21
A	JP 6-141876 A (KYOWA HAKKO KOGYO KK) 24. 5月. 1994 (24. 05. 94) ファミリーなし	1-21

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「B」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「T」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者によって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09. 10. 01

国際調査報告の発送日

23.10.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA, J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上條 肇

4B

9453

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 61-267577 A (ELI LILLY CO.) 27. 11月. 1986 (27. 11. 86) &NO 8504062 A &ES 8607284 A &CN 8507590 A &CA 1273931 A	1-21
A	US 4096331 A (ROBINS CO INC A H) 20. 6月. 1986 (27. 11. 86) &DE 2757766 A &JP 53-92765 A &FR 2376135 A &CA 1077479 A &GB 1588469 A	1-21
A	A. Horiguchi et al., Enzymatic Optical Resolution of N-Benzyl-3-pyrrolidinol, Biosci. Biotech. Biochem. (1995), Vol. 59, No. 7, p. 1287-1290	1-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/06619

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl.⁷ C12N15/53, C12N9/02, C12N1/21, C12P17/10 // (C12N15/53, C12R1:265)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl.⁷ C12N15/53, C12N9/02, C12N1/21, C12P17/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JICST FILE (JOIS), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN),
EMBL/DDBJ/Genbank/PIR/Swissprot/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 98/23769 A1 (Kaneka Corporation), 04 June, 1998 (04.06.98), & JP 10-150998 A	1-21
A	WO 98/23768 A1 (Kaneka Corporation), 04 June, 1998 (04.06.98), & JP 10-150997 A & EP 042068 A & CN 1238905 A & US 6214610 A & KR 2000057221 A	1-21
A	JP 6-141876 A (Kyowa Hakko Kogyo K.K.), 24 May, 1994 (24.05.94) (Family: none)	1-21
A	JP 61-267577 A (Eli Lilly Co.), 27 November, 1986 (27.11.86), & NO 8504062 A & ES 8607284 A & CN 8507590 A & CA 1273931 A	1-21

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents.

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"N" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance of the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
09 October, 2001 (09.10.01)Date of mailing of the international search report
23 October, 2001 (23.10.01)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/06619

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4096331 A (Robbins Co. Inc. A. H.), 20 June, 1986 (20.06.86), & DE 2757766 A & JP 53-92765 A & FR 2376135 A & CA 1077479 A & GB 1588469 A	1-21
A	A. HORIGUCHI et al., "Enzymatic Optical Resolution of N-Benzyl-3-pyrrolidinol", Biosci. Biotech. Biochem., (1995), Vol.59, No.7, pages 1287 to 1290	1-21